

ALERGOTOKSIKOLOGIJA: ISTRAŽIVANJA UTJECAJA POLUTANATA NA POJAVU ALERGIJSKIH REAKCIJA

Božica KANCELJAK-MACAN

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska

Primljeno u siječnju 2009.

Prihvaćeno u srpnju 2009.

Alergotoksikologija je znanstvenoistraživačko područje koje se bavi ispitivanjem utjecaja polutanata (onečišćivača zraka) na nastanak alergijskih reakcija i bolesti. Ispitivanja su prvobitno bila usmjerena na polutante vanjskih prostora, a u novije vrijeme sve više na polutante unutarnjih prostora u kojima ljudi provode većinu vremena. Polutanti po svojoj prirodi mogu biti krute, tekuće ili plinovite čestice, koje se razlikuju s obzirom na veličinu, sastav i izvor iz kojeg nastaju. S obzirom na izvor mogu biti biološkog i nebiološkog podrijetla. Polutanti koji su predmet suvremenih istraživanja s gledišta nastanka alergijskih bolesti su respirabilne krute čestice, ozon, dušični oksidi i bioaerosoli. Mehanizam djelovanja polutanata ovisi o veličini čestica, njihovoj topljivosti i mjestu ulaska u organizam. Dosadašnja ispitivanja su pokazala da različite čestice uvjetuju različite imunosne i neimunosne odgovore u organizmu. Interakcija polutanata i alergena može se zbivati izvan eksponirane osobe, tj. sa samim alergenom ili u eksponiranoj osobi na sluznicama i koži. Polutanti mogu biti nosioci alergena i mogu interferirati na različitim nivoima u nastanku alergijske reakcije. U ovom prikazu razmatraju se dosadašnja saznanja o mehanizmima djelovanja polutanata na alergene, na imunosti sustav izloženih osoba na osnovi epidemioloških populacijskih istraživanja, kliničkih studija ekspozicije u kontroliranim uvjetima i eksperimentalnih testnih sistema *in vivo* i *in vitro*.

KLJUČNE RIJEČI: *alergija na pelud, astma, bioaerosoli, IgE-protutijelo, LLNA, krute respirabilne čestice, onečišćivači zraka, proteinsko-haptenski konjugati*

Alergotoksikologija je znanstvenoistraživačko područje koje se bavi ispitivanjem utjecaja polutanata na nastanak senzibilizacije, pojavu i održavanje alergijskih reakcija (1). Makroklimate i mikroklimatske promjene, ekonomski razvoj, urbanizacija, potrošnja energije, transport, promet motornim vozilima dovode do porasta i promjena izvora onečišćivača zraka u općem i radnom okolišu (2). Osim toga u stalnom su porastu i izvori alergena koji potječu od biljaka, životinja, mikroorganizama, hrane, lijekova i industrijskih procesa. Dosadašnja epidemiološka istraživanja pokazala su koincidenciju porasta alergijskih bolesti

posredovanih IgE-protutijelima i onečišćenja zraka polutantima karakterističnim za zemlje s modernom industrijskom tehnologijom i intenzivnim prometom motornih vozila, tzv. "proces vesternizacije" (3-9) te onečišćenjima zraka unutarnjih prostora ponajprije duhanskim dimom i organskim prašinama (10-14). Interakcija polutanata i alergena može se zbivati izvan eksponirane osobe, tj. sa samim alergenom ili u organizmu s imunostimuliranim sustavom eksponirane osobe. Mehanizam djelovanja polutanata još nije dovoljno razjašnjen, a smatra se da mogu interferirati na različitim nivoima u nastanku i održavanju alergijskih reakcija. Polutanti mogu povećati biološku

raspoloživost i alergogenu potentnost alergena, a time i rizik od nastanka alergijske senzibilizacije te pojačati odgovor dišnih putova na alergene (9). Iako dosadašnji rezultati istraživanja još ne potvrđuju i uzročnu povezanost polutanata i nastanka alergijskih reakcija uzrokovanih IgE-protutijelima, smatra se da ova istraživanja mogu pridonijeti objašnjenju porasta atopijskih bolesti koje zahvaćaju oko 30 % svjetske populacije (8, 15, 16). Suvremena istraživanja upućuju da na porast alergijskih bolesti utječu istodobno i drugi čimbenici okoliša kao što su virusne infekcije (17), osobito respiratornim virusima (18) i suvremeni način života uključujući stanovanje, prehranu (19) i izloženost kroničnom psihološkom stresu (20-23). U ovom prikazu razmatraju se dosadašnja saznanja o djelovanju polutanata vanjskog i unutarnjeg okoliša na alergene te na imunski sustav eksponiranih osoba na osnovi epidemioloških populacijskih istraživanja, kliničkih studija ekspozicije u kontroliranim uvjetima i eksperimentalnih testnih sistema *in vivo* i *in vitro* (1).

POLUTANTI

Polutanti općenito govoreći nisu alergeni, ali mogu biti nosioci alergena i mogu dovesti do egzacerbacije alergijskih bolesti (24). Po svojoj prirodi mogu biti krute, tekuće ili plinovite čestice suspendirane u zraku, koje variraju s obzirom na veličinu, sastav i izvor iz kojeg nastaju (25). Djelovanje ovisi o veličini čestica, topljivosti, sastavu i mjestu ulaska u organizam, najčešće kroz dišni sustav i kožu. Odgovor organizma može biti neimunski i imunski posredovan. S obzirom na izvor iz kojeg nastaju mogu biti biološkog i nebiološkog podrijetla (26).

Izvori polutanata biološkog podrijetla su virusi, bakterije, plijesni, alge, protozoa, grinje, insekti, životinjski i ljudski epitel. U realnom životu najčešća je izloženost mješavini bioloških polutanata za koje su se uvriježili nazivi bioaerosoli i organska prašina (29). Bioaerosoli su polutanti koji se oslobađaju iz mikroorganizama, dovoljno sitni ili topljivi da mogu biti raspršeni u zraku (27, 28). Organska prašina je mješavina biljnih, životinjskih i mikrobnih čestica u zraku i sastavni je dio općeg i profesionalnog okoliša (29-31). Djelovanje bioloških polutanata može biti infektivno, toksično i senzibilizirajuće.

Najčešći polutanti nebiološkog podrijetla su različita vlakna (mineralna, keramička, staklena), produkti izgaranja fosilnih goriva (dušikovi oksidi,

ugljikov monoksid, krute čestice promjera manjeg od 10 μm), hlapljive organske supstancije (formaldehid, glutaraldehid, akrolein, organska otapala) i ozon. Polutanti nebiološkog podrijetla uglavnom su jaki iritansi, a mogu imati i toksično djelovanje. Posebno su važne male krute čestice (PM = Particulate Matter) promjera 2,5 μm , 1,0 μm , 0,1 μm (PM_{2,5}; PM_{1,0}; PM_{0,1}). Čestice manje od 2,5 μm u promjeru, tzv. "respirabilne čestice", nakon udisanja prodiru u dijelove pluća u kojima se izmjenjuju respiratorni plinovi i dovode do morfoloških i funkcionalnih oštećenja (32).

Polutanti vanjskog okoliša

S gledišta istraživanja utjecaja onečišćivača zraka na pojavu i učestalost alergijskih bolesti, ponajprije rinitisa, astme i alergijskog dermatitisa, istraživanja su prvobitno bila usmjerena na ispitivanje utjecaja onečišćivača zraka vanjskih prostora. Glavni generatori polutanata u vanjskom okolišu su industrijski procesi, izgaranje fosilnih goriva, promet motornim vozilima. S toga gledišta najvažnijim polutantima smatraju se krute čestice u ispuhu motornih vozila (PM), sumporov dioksid (SO₂), dušikov dioksid (NO₂) i ozon (O₃) (2, 32). Značajan doprinos na tom području dala su istraživanja grupe istraživača u Njemačkoj nakon 1989. godine, tj. nakon ujedinjenja Njemačke (3, 33, 34). Radilo se o jedinstvenome prirodnom eksperimentu u kojem je genetski i geografski slična populacija bila izložena potpuno različitom tipu atmosferskih onečišćivača. U istočnoj Njemačkoj, vezano uz klasična industrijska postrojenja, onečišćenja zraka su bila posljedica nepotpunog izgaranja ugljena s visokim sadržajem sumpora u uvjetima niskih temperatura i magle (tip I onečišćenja zraka: SO₂, krute čestice). U zapadnoj Njemačkoj onečišćenja zraka bila su posljedica interakcije sunčanog svjetla i ispušnih plinova motornih vozila tipičnih za gradska područja (tip II onečišćenja zraka: NOx, hlapljive organske čestice, ozon i krute čestice promjera manjeg od 2,5 μm (PM_{<2,5}). Ova istraživanja su pokazala značajno veću prevalenciju respiratornih alergijskih bolesti (peludna hunjavica i astma) i veću prevalenciju pokazatelja senzibilizacije (pozitivan prick kožni test na inhalacijske alergene i povišena razina specifičnih IgE-protutijela) u zapadnoj nego u istočnoj Njemačkoj. Tada se uvriježilo stajalište da je tip II onečišćenja okoliša, karakterističan za velike gradove, područja s modernom industrijskom tehnologijom i intenzivnim prometom motornih vozila, povezan s trendom porasta alergijske senzibilizacije i pojave alergijskih bolesti.

U novije vrijeme od osobitog su interesa istraživanja zdravstvenih učinaka malih čestica u ispuhu motornih vozila, koja rabe dizelsko gorivo (DEP = Diesel Exhaust Particles). DEP čine 90 % krutih lebdećih čestica u atmosferi velikih gradova. Karakterizira ih jezgra od ugljika na koju mogu biti adsorbirani visokomolekularni organski spojevi i alergeni (35, 36). Utvrđeno je da DEP mogu utjecati na nastanak senzibilizacije u eksponiranih osoba i pogoršanje simptoma u već senzibiliziranih i oboljelih osoba (35-37).

Polutanti unutarnjeg okoliša

Kako ljudi većinu vremena provode u unutarnjim prostorima, interes istraživača se sve više usmjeruje na ispitivanja utjecaja onečišćivača zraka unutarnjih prostora na nastanak i intenzitet alergijskih reakcija. Generator onečišćivača zraka unutarnjih prostora je suvremeni način stanovanja i života koji karakterizira način gradnje modernih zgrada, uređenje stanova i radnih prostora, emisije iz građevnog materijala i pokućstva, aktivna i pasivna izloženost duhanskom dimu, produkti izgaranja goriva za grijanje i kuhanje, različite kemikalije koje se sve više rabe u kućnim i radnim prostorima. Najvažniji onečišćivači zraka unutarnjih prostora su duhanski dim, dušični oksidi (NO_x), ugljični dioksid (CO₂), ugljični monoksid (CO), organske hlapljive supstancije, ponajprije formaldehid i bioaerosoli (13, 14, 26-28, 38). Većina navedenih onečišćivača poznati su nadražljivci dišnog sustava i kože, a formaldehid može djelovati i kao alergen. Prema projektu INDEX ("Critical Appraisal of the Setting and Implementation of Indoor Exposure Limits in the EU") prioritetni polutanti za istraživanje s gledišta štetnih učinaka na zdravlje su formaldehid, CO, NO₂, benzen i naftalen (38).

Duhanski dim se smatra jednim od glavnih polutanata unutarnjih prostora. Produkti izgaranja duhana imaju iritativno, toksično i kancerogeno djelovanje. Osim toga iz lišća duhana izolirano je imunokemijskim metodama 37 različitih antigenih komponenti, koje induciraju stvaranje različitih vrsta imunoglobulina (39, 40). Istraživanja su pokazala da je duhanski dim rizični čimbenik za nastanak senzibilizacije dišnog sustava, osobito u djece čije majke puše tijekom trudnoće i dojenja (41).

Endotoksin je također važan polutant unutarnjih prostora. Potječe iz membrane gram-negativnih bakterija. U kućnoj se prašini nalazi u varijabilnim koncentracijama koje se smatraju pokazateljima bakterijskog onečišćenja u unutarnjim prostorima.

Endotoksin je lipopolisaharid koji ima učinkovito proupalno djelovanje (42, 43). Zbog toga se smatra da je izloženost endotoksinu rizični čimbenik za težinu kliničke slike astme (44). Osim toga u unutarnjim prostorima ljudi su izloženi višim koncentracijama nekih alergena nego u vanjskim prostorima, osobito od grinja, plijesni i životinja koje žive u tim prostorima (7, 26, 45).

MEHANIZMI DJELOVANJA POLUTANATA

Općenito govoreći, polutanti mogu djelovati izvan organizma na same alergene ili nosioce alergena i u organizmu na imunosne reakcije nakon izloženosti polutantima i/ili polutantima i alergenima istodobno.

Djelovanje na alergene

Mnogobrojna istraživanja interakcije polutanata i alergena rabe kao model peludna zrnca koja su jedan od glavnih izvora alergena u vanjskom okolišu. Studije Behrendta i sur. (1, 3) pokazale su da aglomeracija polutanata na površini peludnog zrnca, osobito organskih tvari, dovodi do njihova međusobnog povezivanja i povezivanja s drugim lebdećima česticama. To omogućuje dulje zadržavanje odnosno veću bioraspoloživost peluda u zraku u određenim područjima kao što su gradska područja i ona s intenzivnim prometom motornih vozila. Polutanti topljivi u vodi oštećuju peludno zrnce i dovode do njegove fragmentacije u znatno manje čestice (*paucimicronic particles*), čime pospješuju oslobađanje specifičnih proteina-antigena iz peludnih zrnaca. Utvrđeno je da vrlo sitne čestice nakon fragmentacije peludnog zrnca mogu biti škrobne i citoplazmatske granule (46), ali i vrlo sitni fragmenti drugih dijelova biljke, npr. lišća, stabljike te tzv. "ubish tjelešca" (*Ubish bodies*) (35, 46). Ova tjelešca su po svojoj strukturi slična peludnom zrcu, samo su manja. Nalaze se također na prašnicima, a njihova funkcija nije razjašnjena (47). Ove čestice kao nosioci specifičnih proteina-antigena zbog svoje znatno manje veličine (2 μm do 5 μm) od peludnih zrnaca mogu nakon udisanja doprijeti i u donje dišne putove te uzrokovati u senzibilizirane osobe i pojavu astme. Naime, peludna zrnca se zbog svoje veličine nakon udisanja deponiraju u gornjim dišnim putovima, pa su zbog toga tipični simptomi polenoze, osim u očima, najčešće izraženi u nosu i nazofarinksu.

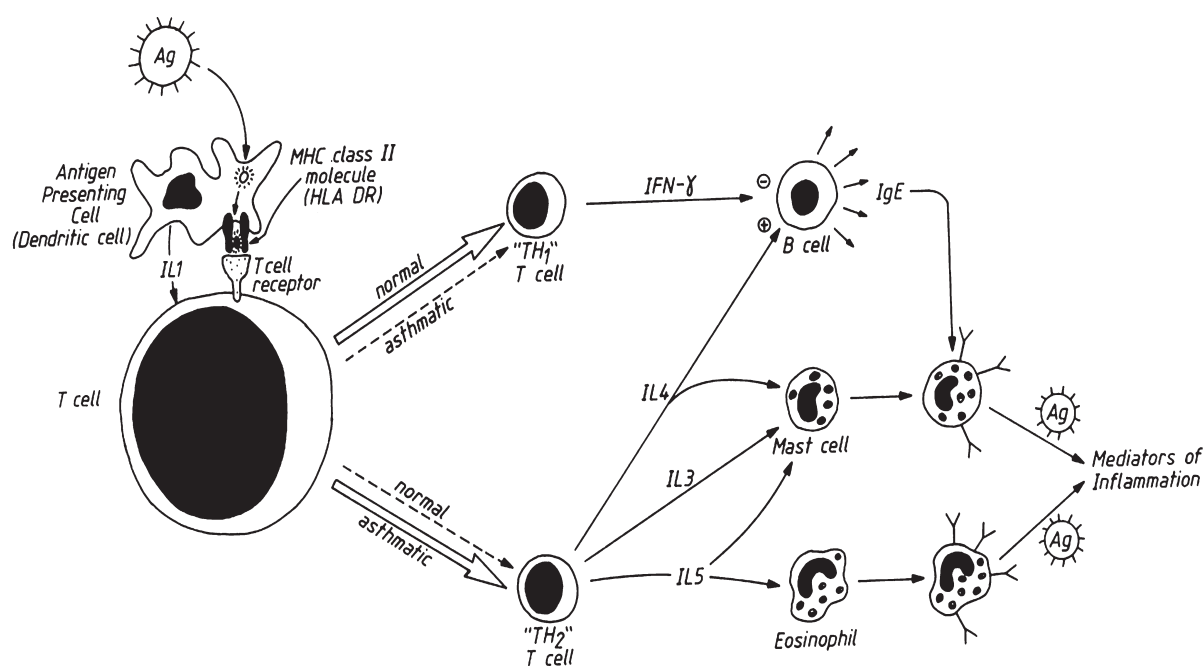
Djelovanje na imunski sustav

Alergiju karakterizira kompleksna upalna reakcija koja počinje prepoznavanjem antigena, a završava celularnim i humoralnim efektorskim reakcijama koje dovode do oštećenja tkiva i pojave bolesti. Nastanak alergije zbiva se u dvije faze: alergijska senzibilizacija i pojava kliničkih simptoma odnosno ekspresija bolesti. S gledišta nastanka senzibilizacije i pojave alergijskih bolesti važno je nekoliko funkcionalnih segmenata imunskog sustava: prezentacija antigena, funkcija T-limfocita i produkcija protutijela. Središnju ulogu u prepoznavanju antigena ima pomoćnički T-limfocit (Th CD 4⁺). Prezentacija antigena Th-limfocitu zbiva se s pomoću stanica koje antigen prezentiraju (APS: dendritične stanice u sluznicama i Langerhansove stanice u koži) ako su u svezi s antigenima klase II glavnoga histokompatibilnosnog kompleksa (MHC), što rezultira stimulacijom, ekspanzijom i distribucijom Th-limfocita u organizmu (48, 49). Za nastanak alergijskih reakcija ključna je stimulacija Th2-podtipa pomoćničkih limfocita. Njihovom aktivacijom luče se interleukini IL-4, IL-13 koji dovode do sinteze cirkulirajućih IgE-protutijela odgovornih za nastanak rane alergijske reakcije i IL-5 koji aktivira eozinofile, što rezultira kasnom alergijskom reakcijom (slika

1) (50). Konačna klinička slika ovisi o mjestu gdje se zbiva interakcija alergena i imunskih stanica, a nastali simptomi su posljedica upale i odgovarajuće hiperreaktivnosti sluznice i kože (51).

Istraživanja su pokazala da polutanti mogu interferirati u nastanku alergijskih reakcija na nivou prepoznavanja antigena, stimulacije Th-limfocita, produkcije protutijela i direktnog oslobađanja medijatora alergijskih reakcija.

Mnogi polutanti s kojima je svakodnevno u kontaktu dišna sluznica i koža su niskomolekularni inertni ili reaktivni kemijski spojevi. Prepoznavanje niskomolekularnih reaktivnih tvari kao antigena, kakvi mogu postati tek metaboliti polutanta nakon biotransformacije u makrofagima, tumači se tzv. "haptenskim" konceptom. Prema haptenskom konceptu supstancija se kao kemijski reaktivna mala molekula (prohaptent) kovalentno veže na proteine ili peptide u organizmu, modificirajući ih tako da postanu strani organizmu, tj. antigeni. Tada ih prepoznaju APS i prezentiraju Th-limfocitima, što dovodi do njihove stimulacije i aktivacije. Ovaj tip stimulacije Th-limfocita dovodi do kompletnog imunskog odgovora, tj. stvaranja specifično senzibiliziranih Th-limfocita i protutijela, a rezultira ranom i kasnom alergijskom reakcijom (52, 53).



Slika 1 Interakcija citokina subpopulacije Th1/Th2-limfocita u alergijskoj astmi (50)

Ag = antigen; MHC = glavni histokompatibilnosni kompleks; HLA DR = ljudski leukocitni antigen DR; IL = interleukin; IFN γ = interferon gama

Inhalirani polutanti mogu direktno uzrokovati nespecifičnu upalu i oksidativni stres s posljedičnim oštećenjem mukocilijarnog klirensa i epitelnih stanica dišne sluznice, što omogućuje bolji pristup antigena stanicama imunskog sustava. Time se može pojačati aktivacija Th2-limfocita, odnosno povećati sinteza IgE-protutijela, što pospješuje senzibilizaciju u predisponiranih osoba i egzacerbaciju simptoma u senzibiliziranih i oboljelih osoba. Istraživanja su pokazala da izloženost O₃, duhanskom dimu i DEP dovodi do povećanog stvaranja IgE-protutijela i u životinja i u ljudi (32, 36, 37). Osim toga nespecifična upala dišne sluznice može povećati postojeću specifičnu reaktivnost dišnih putova i time uzrokovati težu kliničku sliku bolesti čime se može objasniti pojava sve agresivnijih oblika alergijskih bolesti. Metali koji mogu biti sastavni dio čestica u atmosferi mogu direktno utjecati na degranulaciju mastocita i time dovesti do oslobađanja vazoaktivnih i bronhoaktivnih medijatora, što dovodi do pojave simptoma sličnih simptomima u alergijskim reakcijama.

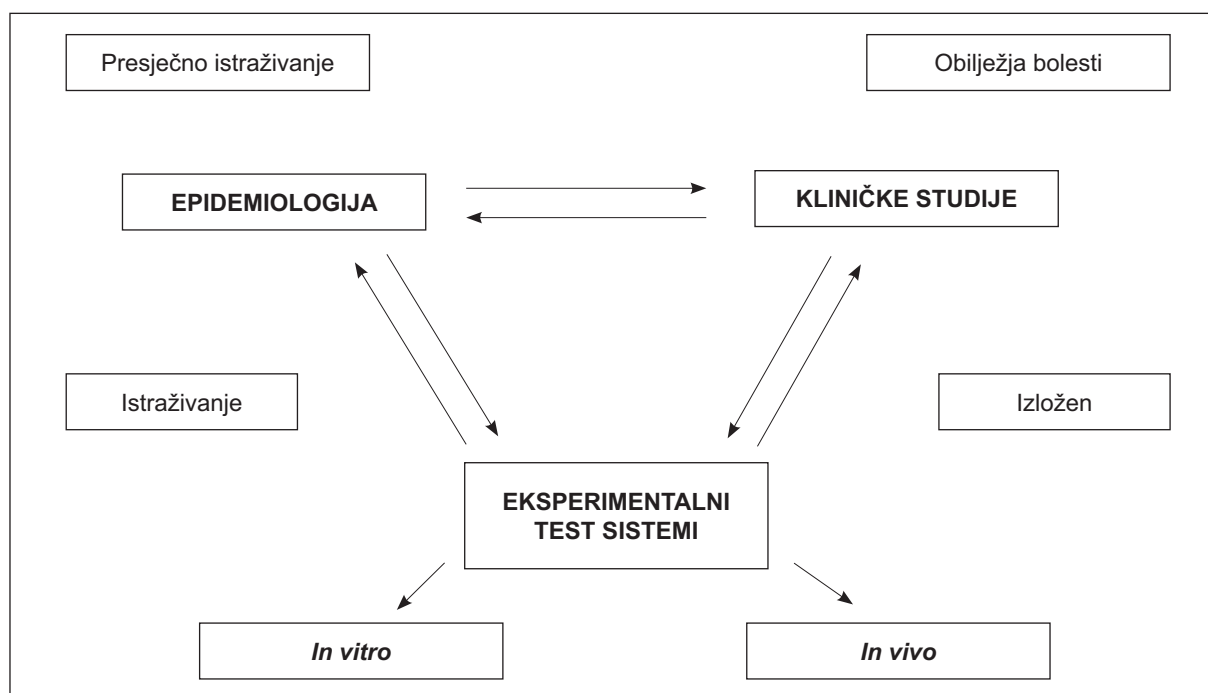
ALERGOTOKSIKOLOŠKA ISTRAŽIVANJA

Rezultati dosadašnjih alergotoksikoloških istraživanja baziraju se na epidemiološkim, kliničkim i eksperimentalnim studijama. Prema Behrendtu

i sur. (1) alergotoksikološki koncept istraživanja ima multidisciplinarni pristup, što uz mjerenja vrste i koncentracije onečišćivača u zraku uključuje epidemiološka populacijska istraživanja, kliničke studije izloženosti u kontroliranim uvjetima i eksperimentalne testne sisteme *in vivo* i *in vitro* (slika 2).

Epidemiološka istraživanja

Epidemiološke studije provode se kao presječna istraživanja (cross-sectional) ili istraživanja parova (eng. *case control*) i uključuju više aspekata: mjerenje vrste i koncentracije onečišćivača u zraku, prevalenciju fenotipskih karakteristika alergijskih bolesti (kožno testiranje s alergenima, nivo specifičnih IgE-protutijela u serumu ispitanika, pojavnost simptoma atopije, mjerenje tkivne hiperreaktivnosti ciljnih organa (15). Rezultati dosadašnjih epidemioloških studija pokazuju trend porasta alergijskih bolesti, ali i velike varijacije učestalosti alergijskih bolesti u svijetu, što se pripisuje različitim čimbenicima, između ostalog, kriterijima koji se rabe za definiciju alergije (8). Naime, treba istaknuti da svatko može biti izložen alergijskoj senzibilizaciji. Pokazatelji senzibilizacije su međutim pozitivni samo u određenom broju osoba (senzibilizirane osobe), a samo se u dijelu senzibiliziranih osoba razviju i simptomi bolesti (oboljele osobe) (5).



Slika 2 Alergotoksikološki koncept istraživanja (1)

Jedan od najčešćih modela za istraživanje međudnosa polutanata i pojave alergijskih bolesti je alergija na pelud. Prvi takav rad publiciran je u Japanu 1987. godine (54). Studija je pokazala značajno veću učestalost polenoze uzrokovane peludom japanskog cedra u populaciji koja stanuje blizu autocesta nego u stanovnika sela okruženog šumom cedra, ali daleko od velikih prometnica i gradova. Nedavno objavljeni rezultati istraživanja odnosa aktualne razine polutanata (SO_2 , NO_2 , PM_{10} , O_3), peluda u zraku i dnevnih simptoma astme u osoba senzibiliziranih na pelud, pokazali su značajno češću pojavu simptoma astme u području gdje su izmjerene koncentracije polutanata bile više nego u području gdje su bile niže (55). Djeca s pozitivnim kožnim testom na opće alergene i bronhalnom hiperreakтивношću koja pohađaju školu blizu cesta s jakim kamionskim prometom imaju značajno više respiratornih simptoma od djece istih obilježja koja pohađaju školu uz ceste sa slabim kamionskim prometom (56, 57). Općenito govoreći, dosadašnja epidemiološka istraživanja upozorila su na veću prevalenciju pokazatelja senzibilizacije i oboljelih od alergijskih bolesti u industrijskim i gradskim područjima nego u neindustrijskim i ruralnim područjima (7, 19, 58, 59). Međutim, dosadašnja istraživanja nedostavno potvrđuju uzročnu povezanost polutanata i alergijskih reakcija. Nedostaju studije koje ispituju prevalenciju astme u odnosu na postojeću razinu polutanata u zraku.

Klinička istraživanja

Kliničke studije ispituju utjecaj onečišćivača zraka na obilježja alergijskih bolesti, a baziraju se na istodobnoj ekspoziciji ispitanika polutantima ili polutantima i alergenima u kontroliranim uvjetima kao što su provokacijski nazalni i bronhalni testovi. Ovakva ispitivanja omogućuju u uvjetima kontrolirane ekspozicije istodobno praćenje učestalosti nastalih simptoma i lokalnog i/ili sistemskog imunskog odgovora određivanjem razine specifičnih protutijela i medijatora alergijske upale. Takva se ispitivanja provode najčešće u oboljelih od alergijske astme i rinitisa. U bronhalnom i nazalnom lavatu oboljelih od astme i/ili rinitisa utvrđeno je da nakon fagocitiranja DEP dolazi do produkcije upalnih citokina IL-6, IL-8 i faktora stimulacije kolonija GM-CSF (eng. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), što dovodi do aglomeracije limfocita, neutrofila, eozinofila s posljedičnim oslobađanjem histamina, ekstravazacijom plazme, kontrakcijom glatke

muskulature i bronhalnom hiperreakтивношću (37, 15). Diaz-Sanches i sur. ispitivali su prvo utjecaj izloženosti DEP na lokalni imunski odgovor u osoba s alergijskim rinitisom uzrokovanim senzibilizacijom na pelud ambrozije, koristeći se tehnikom nazalnoga provokativnog testa. Utvrdili su kvalitativne i kvantitativne promjene u lokalnoj produkciji IgE-protutijela i citokina (60). Naknadno su ispitivanje lokalnog imunskog odgovora proveli nazalnom provokacijom s kombinacijom DEP i alergena ambrozije. Utvrdili su značajno povećan lokalni Th2-odgovor i direktni efekt na stanice u sluznici, što je rezultiralo značajno većom produkcijom specifičnih IgE-protutijela nego nakon nazalne provokacije samo alergenom ambrozije (61). To pokazuje da se u senzibiliziranih osoba bez kliničke ekspresije simptoma u uvjetima prirodne ekspozicije alergenu razina specifičnog IgE i relevantnih citokina može nalaziti u nemjerljivim količinama. Međutim, u uvjetima istodobne izloženosti alergenu i DEP zbog znatno veće produkcije specifičnih IgE-protutijela može doći do pojave simptomatskog oblika bolesti.

Eksperimentalni testni sistemi

Eksperimentalni testni sistemi rabe se za indukciju imunskog odgovora čime se utvrđuje senzibilizirajući potencijal nekog agensa, ponajprije kemikalija kao kontaktnih alergena. Za ovakva ispitivanja *in vivo* rabile su se laboratorijske životinje, u prvom redu zamorčad. U novije vrijeme u miša su razvijeni modeli LLNA (eng. *local lymph node assay*) i PLNA (eng. *popliteal lymph node assay*) kao alternative test modelu na zamorcima. Ovi testovi omogućuju imunizaciju laboratorijske životinje ekstraktom polutanta i alergena odvojeno ili istodobno i utvrđivanje imunskog odgovora u lokalnome limfnom čvoru (62, 63). Kriteriji za pozitivan odgovor i klasifikaciju supstancije kao senzibilizatora baziraju se na kvantitativnom određivanju nastale proliferacije stanica u ekstrahiranome limfnom čvoru i produkciji citokina. Na osnovi produkcije citokina moguće je razlikovati kontaktne od inhalacijskih alergena (64, 65).

PLNA-modelom i ELISA (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) metodom za određivanje specifičnih IgE-protutijela utvrđeno je da krute čestice (PM) bez obzira na veličinu i geografsko podrijetlo dovode do povećanog stvaranja specifičnih IgE-protutijela te da manje čestice pri tome imaju veći efekt nego krupnije čestice (66). Smatra se

da je jedan od najčešćih tipova onečišćenja zraka unutarnjih prostora mješavina ubikvitarnih polutanata i alergena, kao što su endotoksin i inhalacijski alergeni. Eksperimentalna istraživanja pokazala su da istodobna senzibilizacija miša lipopolisaharidom (endotoksinom) i alergenom mačke (Fel d 1) dovodi do alergijskog odgovora (povećano stvaranje IgE, IgG1-protutijela posredovano Th2-limfocitima) i do nealergijskog odgovora (povećano stvaranje IgG2a-protutijela posredovano Th1-limfocitima) (67).

S obzirom na to da se ispitivanja na laboratorijskim životinjama napuštaju, razvijeni su *in vitro* modeli koji uključuju ispitivanja na kulturama stanica (mastociti, bazofili, eozinofili, limfociti) i tzv. *in silico* testni modeli, koji rabe kompjutorske matematičke modele, a senzibilizacijski potencijal se procjenjuje na teoretskoj sposobnosti kemijskog spoja da kovalentno modificira protein (68).

ZAKLJUČAK

Uloga polutanata u alergiji još nije dovoljno razjašnjena. Istraživanja utjecaja polutanata na indukciju, ekspresiju i kronicitet alergijskih reakcija zahtijevaju multidisciplinarni pristup. Polutanti koji su predmet suvremenih istraživanja s gledišta pojave alergijskih bolesti su PM, O₃, NO_x i bioaerosoli. Dosadašnja istraživanja pokazala su da polutanti mogu djelovati na nastanak alergije i na pogoršanje prirodnog tijeka alergijskih bolesti. PM, osobito DEP, mogu u senzibiliziranih i oboljelih osoba povećati produkciju antigen-specifičnih protutijela, promijeniti specifičnu reaktivnost dišnih putova i povećati osjetljivost za bakterijske i virusne infekcije, što rezultira pogoršanjem postojeće alergijske bolesti. Direktni učinak inhaliranih polutanata može biti upalni proces i proces oksidativnog stresa, što dovodi do oslabljenoga mukocilijarnog klirensa i oštećenja respiratornog epitela. Time je omogućen bolji kontakt alergena i imunskih stanica, što u predisponiranih osoba može rezultirati nastankom senzibilizacije. Dosadašnja istraživanja su pokazala veću učestalost i težinu alergijskih bolesti u gradskim i industrijskim područjima nego u ruralnim i industrijski neonečišćenim područjima. Smatra se da je trend porasta alergijskih bolesti povezan sa sinergističkim djelovanjem više čimbenika okoliša. Za alergijsku astmu taj sinergizam čine virusne infekcije, izloženost alergenima i polutantima.

LITERATURA

1. Behrendt H, Krämer U, Schäfer T, Kasche A, Eberlein-König B, Darsow U, Ring J. Allergotoxicology - a research concept to study the role of environmental pollutants in allergy. *Allergy Clin Immunol Int* 2001;13:122-8.
2. Chen B, Kan H. Air pollution and population health: a global challenge. *Environ Health Prev Med* 2008;13:94-101.
3. Behrendt H, Friedrichs K, Krämer U. The role of indoor and outdoor air pollution in allergic diseases. U: Johansson S, urednik. *Progress in allergy and clinical immunology*. Seattle: Hogrefe & Huber; 1995. str. 83-9.
4. Ring J. Allergy and modern society: does "Western life style" promote the development of allergies? *Int Arch Allergy Immunol* 1997;113:7-10.
5. Wahn U. What drives the allergic march? *Allergy* 2000;55:591-9.
6. Strannegård Ö, Strannegård I-L. The causes of the increasing prevalence of allergy: is atopy a microbial deprivation disorder? *Allergy* 2001;56:91-102.
7. Wright RJ, Weiss ST. Epidemiology of allergic diseases. U: Holgate ST, Church MK, Lichenstein LM, urednici. *Allergy*. 2. izd. London (UK): Mosby International Ltd.; 2001. str. 203-12.
8. Cruz AA, Popov T, Pawankar R, Annesi-Maesano I, Fokkens W, Kemp J, Ohta K, Price D, Bousquet J. Common characteristics of upper and lower airways in rhinitis and asthma: ARIA update, in collaboration with GA²LEN. *Allergy* 2007;62(Suppl 84):1-41.
9. Mösges R, Klimek L. Today 's allergic rhinitis patients are different: new factors that may play role. *Allergy* 2007;62:969-75.
10. Björkstén B, Kjellman BN-IM, Zeiger RS. Development and Prevention of Allergic Disease in Childhood. U: Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EE, Adkinson NF Jr, Yunginger JW, Busse WW, urednici. *Allergy - Principles and practice*. 5. izd. St Louis (MO): CV Mosby; 1998. str. 816-37.
11. Hoffmann D, Wynder EL. Indoor air quality: Tobacco smoke. U: Stellman JA, urednik. *Encyclopedia of occupational health and safety*. 4. izd. Vol 1. Ženeva: ILO; 1998. str. 44.11-4.
12. Flannigan B. Indoor air quality: Biological contamination. U: Stellman JA, urednik. *Encyclopedia of occupational health and safety*. 4. izd. Vol 1. Ženeva: ILO; 1998. str. 44.21-26.
13. World Health Organization (WHO). Indoor air quality: biological contaminants. WHO Regional Publications, European Series, No. 31. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 1990. str. 1-67.
14. WHO Air quality guideline for particulate matter, ozone, nitrogen, dioxide and sulfur dioxide. Global update 2005. Summary of risk assessment [displayed 2 February 2010]. Available at: http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_SDE_PHE_OEH_06.02_eng.pdf
15. Kunkel G, Schierhorn K. Air pollution and allergic and nonallergic airway disease. *Allergy Clin Immunol Int* 1999;11:82-5.
16. Eigenmann PA. Diagnosis of allergy syndromes: do symptoms always mean allergy? *Allergy* 2005;60(Suppl 79):6-9.
17. Čustović A, Murray C, Simpson A. Allergy and infection: understanding their relationship. *Allergy* 2005;60(Suppl 79):10-3.

18. Bacharier LB, Boner A, Carisen KH; Eigenmann PA, Frischer T, Götz M, Helms PJ, Hunt J, Liu A, Papadopoulos N, Plattts-Mills T, Pohunek P, Simons FER, Valovirta E, Wahn U, Wildhaber J, The European Pediatric Asthma Group. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. *Allergy* 2008;63:5-34.
19. Nicolaou N, Siddique N, Custovic A. Allergic disease in urban and rural populations: increasing prevalence with increasing urbanization. *Allergy* 2005;60:1357-60.
20. Kilpeläinen M, Koskenvuo M, Helenius H, Terho EO. Stressful life events promote the manifestation of asthma and atopic diseases. *Clin Exp Allergy* 2002;32:256-63.
21. Pruett SB. Stress and the immune system. *Patophysiol* 2003;9:133-53.
22. Kanceljak-Macan B, Macan J, Plavec D, Milković-Kraus S, Žuškin E. Alergijski poremećaji dišnog sustava i kože kao javno zdravstveni problem. *Liječ Vjesn* 2003;125:81-7.
23. Radošević-Vidaček B, Macan J, Košćec A. Stres i alergija. *Arh Hig Rada Toksikol* 2004;55:205-11.
24. Thompson PJ, Stewart GA, Samet JM. Allergens and pollutants. U: Holgate ST, Church MK, Lichenstein LM, urednici. *Allergy*. 2. izd. London: Mosby International Ltd.; 2001. str. 213-42.
25. Pope CA. Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: biologic mechanisms and who's at risk? *Environ Health Persp* 2000;108(Suppl 4):713-23.
26. Leslie GB. Health risk from indoor air pollutants: public alarm and toxicological reality. *Indoor Built Environ* 2000;9:5-16.
27. Burge HB. Bioaerosols: Prevalence and health effects in the indoor environment. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86:687-701.
28. Gomzi M. Unutrašnji prostor i zdravlje. *Sigurnost* 2000;42:257-65.
29. Rylander R, Schilling RSF. Diseases caused by organic dust. U: Stellman JA, urednik. *Encyclopedia of occupational health and safety*. 4. izd. Vol 1. Ženeva: ILO; 1998. str. 10.24-7.
30. Žuškin E, Mustajbegović J, Kern J, Ivanković D, Kanceljak B. Učinci organskih aerosola na dišni sustav profesionalno izloženih osoba. *Liječ Vjesn* 2003;125:151-6.
31. Kanceljak-Macan B, Žuškin E, Macan J. Organic aerosols and the development of allergic disorders. *Arh Hig Rada Toksikol* 2004;55:213-20.
32. Brunekreef B, Holgate ST. Air pollution and health. *Lancet* 2002;360:1233-42.
33. von Mutius E, Fritzsche C, Weiland S, Röhl G, Magnussen H. Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: A descriptive comparison. *Br Med J* 1992;305:1395-9.
34. Treпка MJ, Heinrich J, Wichmann HE. The epidemiology of atopic diseases in Germany: an East-West comparison. *Rev Environ Health* 1996;11:119-31.
35. D'Amato G. Airborne paucimicronic allergen-carrying particles and seasonal respiratory allergy. *Allergy* 2001;56:1109-1111.
36. Bartra J, Mullol J, del Cuvillo A, Dávila I, Ferrer M, Jáuregui I, Montoro J, Sastre J, Valero A. Air pollution and allergens. *J Investig Alergol Clin Immunol* 2007;17(Suppl 2):3-8.
37. D'Amato G, Liccardi G, D'Amato M, Cazzola M. Outdoor air pollution, climatic changes and allergic bronchial asthma. *Eur Resp J* 2002;20:763-76.
38. Koistinen K, Kotzias D, Kephelopoulous S, Schlitt C, Carrer P, Jantunen M, Kirchner S, McLaughlin J, Mølhave L, Fernandes EO, Seifert B. The INDEX project: executive summary of a European Union project on indoor air pollutants. *Allergy* 2008;63:810-9.
39. Salvaggio JE, Lehrer SB, Stankus RP. Smoking and allergy. U: Pichler WJ, Stadler BM, Dahinden CA, Pecoud AR, Frei P, Schneider CH, de Weck AL, urednici. *Progress in allergy and clinical immunology*. Toronto (CA): Hogrefe & Huber Publishers; 1989. str. 259-6.
40. Paoletti P, Baldacci S, Simoni M, Biavati P, Carrozzi L, Pedreschi M, Modena P, Vellutini M, Diviggiano E, Ballerin L, Viegi G, Sapigni Z, Giuntini C. Tobacco smoking and allergy. U: Godard PH, Bousquet J, Michel FB, urednici. *Advances in allergology and clinical immunology*. Carnforth (UK): Parthenon Publishing Group Ltd.; 1992. str. 349-58.
41. Björkstén B. Risk factors in early childhood for the development of atopic diseases. *Allergy* 1994;49:400-7.
42. Reed CE, Milton DK. Endotoxin-stimulated innate immunity a contributing factor for asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108: 157-66.
43. Varnai VM, Macan J, Plavec D, Jureša D. Endotoxin measurement in house dust using the end-point Limulus amoebocyte lysate method. *Arh Hig Rada Toksikol* 2004;55:175-81.
44. Michel O, Kips J, Duchateau J, Vertongen F, Robert L, Collet H, Pauwels R, Sergysels R. Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1641-6.
45. Kanceljak-Macan B, Macan J, Plavec D. Alergeni vanjskih i unutarnjih prostora i dišni sustav. *Arh Hig Rada Toksikol* 2000;51:321-33.
46. Motta AC, Marliere M, Peltre G, Sterenberg PA, Lacroix G. Traffic-related air pollutants induce the release of allergen-containing cytoplasmic granules from grass pollen. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;139:294-8.
47. D'Amato G, Cecchi L, Bonini S, Nunes C, Annesi-Maesano I, Behrendt H, Liccardi G, Popov T, van Cauwenberge P. Allergen pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy* 2007;62:976-90.
48. Vos JG, von Loveren H. Immunotoxicology. U: Stellman JA, urednik. *Encyclopedia of occupational health and safety*. 4. izd. Vol 1. Ženeva: ILO; 1998. str. 33.35-9.
49. Dekaris D, Rabić S. *Imunologija*. U: Vrhovac B, urednik. *Interna medicina*. 3. izd. Zagreb: Naklada Ljevak d.o.o.; 2003. str. 53-67.
50. Holgate S. 18th Meeting of the Collegium Internationale Allergologicum, Madeira 1990. *Allergy Today* 1991;4(1):12-14.
51. Kanceljak-Macan B. Suvremeni pogledi na alergijske bolesti. *Arh Hig Rada Toksikol* 2004;55:123-34.
52. Smith Pease CK. From xenobiotic chemistry and metabolism to better prediction and risk assesment of skin allergy. *Toxicology* 2003;192:1-22.
53. Gerber BO, Pichler WJ. Cellular mechanisms of T cell mediated drug hypersensitivity. *Curr Opin Immunol* 2004;16:732-7.
54. Ishizaki T, Koizumi K, Ikemori R, Ishiyama Y, Kushibiki E. Studies of prevalence of Japanese cedar pollinosis among the residents in a densely cultivated area. *Ann Allergy* 1987;58:265-70.

55. Brito FF, Gimeno PM, Martinez C, Tobias A, Suárez L, Guerra F, Borja JM, Alonso AM. Air pollution and seasonal asthma during the pollen season. A cohort study in Puertollano and Cindad Real (Spain). *Allergy* 2007;62:1152-7.
56. Janssen NAH, Brunekreef B, van Vliet P, Aarts F, Meliefste K, Harssema H, Fischer P. The relationship between air pollution from heavy traffic and allergic sensitisation, bronchial hyperresponsiveness, and respiratory symptoms in Dutch schoolchildren. *Environ Health Perspect* 2003;111:1512-8.
57. Jögi R, Jansson C, Björnsson E, Boman G, Björkstén B. The prevalence of asthmatic respiratory symptoms among adults in an Estonian and Swedish university town. *Allergy* 1996;51:331-6.
58. Macan J, Kanceljak-Macan B, Mustač M, Milković-Kraus S. Analysis of dust samples from urban and rural occupational environments in Croatia. *Arh Hig Rada Toksikol* 2005;56:327-32.
59. Banac S, Tomulić KL, Ahel V, Rozmanić V, Šimundić N, Zubović S, Milardović A, Topić J. Prevalence of asthma and allergic diseases in Croatian children is increasing: survey study. *Croat Med J* 2004;45:721-6.
60. Diaz-Sanches D, Tsien A, Casillas A, Dotson AR, Saxon A. Enhanced nasal cytokine production in humans following *in vivo* challenge with diesel exhaust particles. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:114-9.
61. Diaz-Sanches D, Tsien A, Fleming J, Saxon A. Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human *in vivo* nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a T helper cell 2-type pattern. *J Immunol* 1997;158:2406-13.
62. van Och FMM, Vandebriel RJ, De Jong WH, van Loveren H. Effect of prolonged exposure to low antigen concentration for sensitization. *Toxicology* 2003;184:23-30.
63. van den Berg FA, Baken KA, Vermeulen JP, Gremmer ER, van Steeg H, van Loveren H. Use of the local lymph node assay in assessment of immune function. *Toxicology* 2005;211:107-14.
64. Vandebriel RJ, De Jong WH, Spiekstra SW, van Dijk M, Fluitman A, Garssen J, van Loveren H. Assessment of preferential T-helper 1 or T-helper 2 induction by low molecular weight compounds using the local lymph node assay in conjunction with RT-PCR and ELISA for interferon- γ and interleukin-4. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;162:77-85.
65. Løvik M, Alberg T, Nygaard UC, Samuelsen M, Groeng EC, Gaarder PI. Popliteal lymph node (PLN) assay to study adjuvant effects on respiratory allergy. *Methods* 2007;41:72-9.
66. Dybing E, Løvdal T, Hetland RB, Løvik M, Schwarze PE. Respiratory allergy adjuvant and inflammatory effects of urban ambient particles. *Toxicology* 2004;198:307-14.
67. Ormstad H, Groeng E-C, Duffort O, Løvik M. The effect of endotoxin on the production of IgE, IgG1 and IgG2a antibodies against the cat allergen Fel d 1 in mice. *Toxicology* 2003;188:309-18.
68. MacKay C, Bajaria S, Shaver G, Kudrycki K, Ramanujan S, Peterso T, Friedrich C, Maxwell G, Jowsey I, Lockley D, Reynolds F, Fentem J. *In silico* modelling of skin sensitization. *Toxicology* 2007;231:103.

Summary

ALLERGOTOXICOLOGY: RESEARCH OF POLLUTANT INFLUENCE ON THE DEVELOPMENT OF ALLERGIC REACTIONS

Allergotoxicology studies the influence of pollutants on the development of allergic reactions and diseases. At the beginning, the research was focused on outdoor air pollutants, while recently it turns to the indoor environment, mainly because people this is where people spend most of their time. Air pollutants may be solid, soluble, or gaseous particles in nature, and they can differ in size, structure, and sources. Pollutants can be of biological or nonbiological origin. Currently interesting air pollutants include particulate matter, ozone, nitrogen oxides, and bioaerosols. The mechanisms of pollutant activity depend on the particle size, solubility, site of deposition, and specific chemical properties. Recent studies have shown that different pollutants provoke different immunological and nonimmunological responses in exposed persons. Interaction between air pollutants and allergens can take place outside the exposed person i.e. with allergen itself, or inside the organism on mucous membranes and skin. Pollutants may be the carriers of allergens and may exacerbate allergic reactions and diseases. This review presents recent views about the mechanisms of pollutant activity on allergens and immune system response in exposed persons, based on epidemiological population studies, clinical studies of exposure under controlled conditions, and experimental tests *in vitro* and *in vivo*.

KEY WORDS: *air pollutants, allergens, asthma, bioaerosols, IgE antibody, LLNA, particulate matter, pollen allergy, protein-hapten conjugates*

CORRESPONDING AUTHOR:

Dr.sc. Božica Kanceljak-Macan, dr.med., prim.
Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
p.p 291, HR-10001, Zagreb
E-mail: bkancelj@imi.hr